

UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Ivane Ćuruvije

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 21.10.2021. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata dipl. farm. Ivane Ćuruvije, pod naslovom:

„Polne i sojne specifičnosti promena citokinskog profila makrofaga ženki pacova u reproduktivnom starenju“

Komisija u sastavu:

1. dr sc. Stanislava Stanojević, naučni savetnik, Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“
2. dr sc. Gordana Leposavić, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. dr sc. Marijana Stojanović, naučni savetnik, Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“, Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

Mentori:

dr sc. Nevena Arsenović Ranin, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

dr sc. Vesna Vujić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći:

IZVEŠTAJ

1. OSNOVNI PODACI O KANDIDATU I DISERTACIJI

A. Osnovni podaci o kandidatu

Ivana Ćuruvija (rođena Jakovljević) je rođena 26.10.1986. u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu, a školske 2005/2006. godine upisala je diplomske osnovne studije – studijski profil diplomirani farmaceut, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2011. god. sa prosečnom ocenom 8,48 i ocenom na diplomskom ispitu 10. Državni ispit je položila 2012. godine, nakon čega je bila zaposlena kao diplomirani farmaceut u apoteci.

Školske 2013/2014 godine Ivana Ćuruvija je upisala doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, iz oblasti Farmakologije /Imunofarmakologije. Od decembra 2013. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik, a potom i kao istraživač saradnik u Odseku za naučnoistraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“.

U periodu 2013.- 2019. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena (OII75050, MPNTR RS), oblast Medicina, pod rukovodstvom dr Gordane Leposavić, redovnog profesora na Katedri za patobiologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon toga, u periodu 2020-2021. godine, istraživački rad Ivane Ćuruvije je finansiran na osnovu Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO potpisanom između Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

B. Naslov disertacije

„Polne i sojne specifičnosti promena citokinskog profila makrofaga ženki pacova u reproduktivnom starenju“

C. Obim disertacije

Disertacija je napisana na 144 strane i sadrži poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija sadrži ukupno 51 sliku, i to 1 u poglavlju Materijal i metode, i 50 u poglavlju Rezultati, dok je u poglavlju Literatura citirano 454 literaturnih navoda.

D. Bibliografski podaci.

U dosadašnjem naučnoistraživačkom radu Ivana Ćuruvija je kao autor ili koautor objavila 9 radova, i to 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21) i 4 rada u

istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22). Na skupovima međunarodnog značaja učestvovala je sa 6 saopštenja, a na skupu nacionalnog značaja sa 4 saopštenja.

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, **Ivana Ćuruvija**, Katarina Veljović, Svetlana Soković Bajić, Jelena Kotur-Stevuljević, Andrija Bogdanović, Raisa Petrović, Ivana Vujnović, Vesna Kovačević-Jovanović. Oral treatment with *Lactobacillus rhamnosus* 64 during the early postnatal period improves the health of adult rats with TNBS-induced colitis. *Journal of Functional Foods* 2018; 48:92-105. doi:10.1016/j.jff.2018.07.014 Impact factor (2018): 3,197; Rang časopisa u oblasti Food Science and technology: 33/135
2. Veljko Blagojević, Stanislava Stanojević, **Ivana Ćuruvija**, Raisa Petrović, Ivana Vujnović, Vesna Vujić, Vesna Kovačević-Jovanović. Rat strain differences in peritoneal immune cell response to selected gut microbiota: a crossroad between tolerance and autoimmunity? *Life Sciences* 2018; 197:147-157. doi: 10.1016/j.lfs.2018.02.011 Impact factor (2018): 3,448; Rang časopisa u oblasti Pharmacology and Pharmacy: 76/267
3. Stanislava Stanojević, **Ivana Ćuruvija**, Veljko Blagojević, Raisa Petrović, Ivana Prijić, Vesna Vujić. The involvement of estrogen receptors α and β in the in vitro effects of estradiol on secretory profile of peritoneal macrophages from naturally menopausal female and middle-aged male rats. *Experimental Gerontology* 2018; 113:86-94. doi: 10.1016/j.exger.2018.09.024 Impact factor (2016): 3,340; Rang časopisa u oblasti Geriatrics and Gerontology: 12/49
4. Stanislava Stanojević, **Ivana Ćuruvija**, Veljko Blagojević, Raisa Petrović, Vesna Vujić, Mirjana Dimitrijević, Strain-dependent response to stimulation in middle-aged rat macrophages: A quest after a useful indicator of healthy aging. *Experimental Gerontology* 2016; 85: 95-107. doi: 10.1016/j.exger.2016.10.005 Impact factor (2016): 3,340 Rang časopisa u oblasti Geriatrics and Gerontology: 12/49
5. Mirjana Dimitrijević, Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, **Ivana Ćuruvija**, Ivana Vujnović, Raisa Petrović, Nevena Arsenović-Ranin, Vesna Vujić, Gordana Laposavić, Aging affects the responsiveness of rat peritoneal macrophages to GM-CSF and IL-4. *Biogerontology* 2016; 17:359- 371. doi:10.1007/s10522-015-9620-x Impact factor (2016): 3,231 Rang časopisa u oblasti Geriatrics and Gerontology: 14/49

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, **Ivana Ćuruvija**, Vesna Vujić. *Lactobacillus rhamnosus* affects rat peritoneal cavity cell response to stimulation with gut microbiota: focus on the host innate immunity. *Inflammation* 2021; doi: 10.1007/s10753-021-01513-z (u štampi) Impact factor (2020): 4,092 Rang časopisa u oblasti Immunology: 85/162
2. **Ivana Ćuruvija**, Stanislava Stanojević, Nevena Arsenović-Ranin, Veljko Blagojević, Mirjana Dimitrijević, Biljana Vidić-Danković, Vesna Vujić. Sex differences in macrophage functions in middle-aged rats: relevance of estradiol level and macrophage estrogen receptor expression. *Inflammation* 2017; 40:1087-1101. doi: 10.1007/s10753-017-0551-3 Impact factor (2017): 2,884 Rang časopisa u oblasti Immunology: 87/155
3. Stanislava Stanojević, Vesna Kovačević-Jovanović, Mirjana Dimitrijević, Vesna Vujić, **Ivana Ćuruvija**, Veljko Blagojević, Gordana Laposavić. Unopposed estrogen

supplementation/progesterone deficiency in post-reproductive age affects the secretory profile of resident macrophages in a tissue-specific manner in the rat. *American Journal of Reproductive Immunology* 2015; 74:445-456. doi:10.1111/aji.12424 Impact factor (2015): 3,115 Rang časopisa u oblasti Immunology: 65/151

4. Sònia Garcia, Oriane Hidalgo, **Ivana Jakovljević**, S. Siljak-Yakovlev, Josep Vigo, Teresa Garnatje, Joan Vallès. New data on genome size in 128 Asteraceae species and subspecies, with first assessments for 40 genera, 3 tribes and 2 subfamilies. *Plant Biosystems* 2013; 147:1219-1227. doi:10.1080/11263504.2013.863811 Impact factor (2014): 1,920 Rang časopisa u oblasti Plant Science: 67/204

Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

1. Veljko Blagojević, Vesna Vujić, **Ivana Ćuruvija**, Katarina Veljović, Svetlana Sokolović Bajić, Stanislava Stanojević. Sex differences in the effects of early-life probiotic treatment on TNBS-induced colitis in rats. *Eur. J. Immunol.* Vol 51 (Suppl.1):311. 6 th European Congress of Immunology, Belgrade (Virtual meeting), Serbia, 1-4 September 2021.
2. **Ivana Ćuruvija**, Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, Raisa Petrović, Ivana Prijić, Vesna Vujić. 17 β -estradiol and genistein affect macrophage inflammatory cytokine production during aging in sex-specific manner. *Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches*, Belgrade, Serbia, 6-8 December 2019.
3. Veljko Blagojević, Raisa Petrović, **Ivana Ćuruvija**, Ivana Prijić, Vesna Vujić, Stanislava Stanojević. Potential impact of early-life probiotic supplementation on peritoneal macrophage function. *Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches*, Belgrade, Serbia, 6-8 December 2019.
4. Stanislava Stanojević, **Ivana Ćuruvija**, Veljko Blagojević, Ivana Vujnović, Raisa Petrović, Mirjana Dimitrijević, Gordana Laposavić. Aging affects rat inflammatory peritoneal exudate composition and macrophage inflammatory mediator production in a strain-dependent manner. 3rd Belgrade EFIS Symposium On Immunoregulation Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Arandjelovac Spa, Serbia, 24-27 May 2015.
5. Veljko Blagojević, **Ivana Ćuruvija**, Raisa Petrović, Ivana Vujnović, Mirjana Dimitrijević, Vesna Vujić, Stanislava Stanojević, Gordana Laposavić. Aged rat macrophages exhibit impaired response to in vitro stimulation with IL-4. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna, Austria, 6-9 September 2015.
6. Aleksandra Buha, Zorica Bulat, Veljko Petrović, **Ivana Jakovljević**, Teodora Đikić, Aleksandra Grković, Vesna Matović. Carbon monoxide levels in blood of smokers and non-smokers determined by gas chromatography. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, Vol 57, S149-S150, 5th Congress of Pharmacy of Macedonia with international participation, Ohrid, Macedonia, September 2011

Saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Ivana Ćuruvija**, Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, Vesna Cvetković, Vesna Kovačević-Jovanović. Perzistencija *lactobacillus rhamnosus* -a i uticaj na produkciju NO u crevu pacova. XI Kongres Mikrobiologa Srbije – Mikromed, Beograd, 11-13. maj 2017.

2. Veljko Blagojević, Stanislava Stanojević, **Ivana Ćuruvija**, Vesna Cvetković, Vesna Kovačević-Jovanović. Efekti *L. rhamnosus* LB64 na translokaciju bakterija creva i sintezu NO u slezini tokom kolitisa. XI Kongres Mikrobiologa Srbije – Mikromed, Beograd, 11-13. maj 2017.
3. **Ivana Ćuruvija**, Stanislava Stanojević, Vesna Kovačević-Jovanović, Mirjana Dimitrijević, Vesna Vujić, Veljko Blagojević, Gordana Leposavić. Promene u citokinskom sekretornom profilu makrofaga starih ženki pacova usled nedostatka progesterona u postreproduktivnom periodu. VII Naučni sastanak Društva imunologa Srbije, Beograd, 27-28. april 2016. (usmeno saopštenje)
4. Raisa Petrović, Mirjana Dimitrijević, Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, **Ivana Ćuruvija**, Ivana Vujnović, Nevena Arsenović Ranin, Vesna Vujić, Gordana Leposavić. Starenje utiče na M1/M2 polarizaciju rezidentnih peritonealnih makrofaga pacova stimulisanih *in vitro*. VII Naučni sastanak Društva imunologa Srbije, Beograd, 27-28. april 2016.

2. PREDMET I CILJ DISERTACIJE

Predmet disertacije dipl. farm. Ivane Ćuruvije bio je ispitivanje uticaja reproduktivnog starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike rezidentnih i tioglikolatnim medijumom indukovanih ćelija peritonealne šupljine ženki pacova i značaja promena u koncentraciji polnih steroida i genetskih faktora za ove promene. Ciljevi ove disertacije su bili da se ispita 1) uticaj rane faze reproduktivnog starenja na fenotipske osobine (ekspresija markera povezanih sa aktivacijom i poreklom/funkcijom) i funkcijska svojstva (fagocitoza, sinteza inflamatornih medijatora) makrofaga izolovanih iz “mirne” i inflamirane (delovanjem tioglikolata) peritonealne duplje ženki Albino Oxford (AO) pacova, 2) značaj genetskih faktora za reproduktivnim starenjem uslovljene promene peritonealnih makrofaga od značaja za uspešnu rezoluciju akutnog zapaljenja uporednom analizom promena kod ženki AO i Dark Agouti (DA) soja pacova i 3) uloga polnih steroida u nastanku ovih promena uporednom analizom promena kod mužjaka i ženki AO pacova, njihovom analizom kod ženki AO pacova kojima su na kraju reproduktivnog perioda uklonjeni jajnici i ispitivanjem delovanja estradiola na makrofage mladih i sredovečnih ženki AO pacova *in vitro*.

3. OSNOVNE HIPOTEZE

Istraživanja sprovedena u okviru disertacije bila su zasnovana na hipotezi da promene u koncentraciji polnih steroida u cirkulaciji i genetski faktori i utiču na sposobnost makrofaga da tokom starenja “kontrolisu” rezoluciju akutnog zapaljenja i time razvoj sistemskog, sterilnog hroničnog zapaljenja (engl. „inflammaging”) do kojeg dolazi tokom starenja. Istraživanja u ovoj disertaciji su potvrdila postavljenu hipotezu.

4. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

U **Uvodu** je, kroz 4 potpoglavlja (*Makrofage; Inflamatorni odgovor u starenju: uloga makrofaga; Sojne razlike u inflamatornom odgovoru: uloga makrofaga; Polne razlike u inflamatornom odgovoru: uloga makrofaga*) dat pregled naučnih saznanja značajnih za predmet proučavanja doktorske disertacije.

U prvom potpoglavlju **Uvoda** (*Makrofage*) prikazana su postojeća saznanja o biologiji ovih ćelija i njihovoj ključnoj ulozi u odbrani od patogena. Objašnjeno je da zahvaljujući njihovoj sposobnosti ingestije patogena, sekrecije različitih medijatora, ali i svojstvima prezentacije antigena pomoćničkim T ćelijama, makrofage učestvuju u uništavanju mikroorganizama, razvoju i kontroli inflamacije, reparaciji tkiva i u aktivaciji adaptivnog imunskog odgovora koji deluje sinergistički s inflamatornim odgovorom u eliminaciji patogena. Navedeno je da su makrofage prisutne u svim vezivnim tkivima i u svakom organu. Međutim, makrofage mogu da vode poreklo od cirkulišućih monocita koji tokom zapaljenske reakcije ulaze u periferna tkiva, sazrevavaju i postaju makrofage, ali i iz progenitora iz žumančane kese ili fetalne jetre koji odlaze u tkiva i tamo postaju specijalizovane tkivne rezidentne makrofage. Posebno su istaknute karakteristike rezidentnih makrofaga peritonealne šupljine i opisan je tioglikolatnim medijumom (TG) indukovani peritonitis, jedan od često korišćenih modela sterilne inflamacije. U nastavku ovog potpoglavlja navedeni su receptori ispoljeni na makrofagama koji su uključeni u aktivaciju i funkciju ovih ćelija., Opisana su dva različita puta aktivacije makrofaga, klasični, koji dovodi do nastanka M1 makrofaga koje imaju ulogu u eliminaciji patogena i pokretanju inflamacije, i alternativni, koji rezultira nastankom M2 makrofaga koje učestvuju u reparaciji tkiva i kontroli inflamacije. U završnom delu ovog potpoglavlja opisan je sekretorni profil makrofaga u zavisnosti od puta njihove aktivacije, uz detaljan opis delovanja proinflamatornih i antiinflamatornih citokina i visoko reaktivnih metabolita kiseonika i azota. U drugom potpoglavlju Uvoda (*Inflamatorni odgovor u starenju: uloga makrofaga*) opisane su promene u urođenom imunskom odgovoru sa starenjem koje dovode do fenomena oksidativno-inflamatornog starenja (engl. oxi-inflamm-aging) koje se karakteriše razvojem sistemskog, sterilnog, blagog hroničnog zapaljenja praćenog povišenim vrednostima proinflamatornih citokina, za koji se smatra da je uključen u patogenezu različitih bolesti u starijoj populaciji. Navedeno je da ćelije urođene imunosti postaju manje funkcionalne, i paradoksalno, više inflamatorne sa starenjem, dok su literaturni podaci vezani za promene u aktivnosti makrofaga relativno oskudni i nekonzistentni. Poslednji deo ovog potpoglavlja ističe značaj izučavanja promena u inflamatornom odgovoru tokom starenja, sa ciljem da se ove promene što je moguće više odlože i ublaže. Treće potpoglavlje Uvoda (*Sojne razlike u inflamatornom odgovoru: uloga makrofaga*) daje literaturni pregled podataka u vezi sa uticajem genetskih faktora (sojnih razlika) na razvoj i ishod inflamatornih bolesti, kao i ishod infekcije. Istaknute su razlike u produkciji inflamatornih/antiinflamatornih medijatora makrofaga mladih i sredovećnih pacova AO i DA soja. Četvrto poglavlje Uvoda (*Polne razlike u inflamatornom odgovoru: uloga makrofaga*) opisuje značaj potencijalnih razlika u ekspresiji gena koje zavise od polnih hromozoma, ali i značaj polnih steroida, za polne razlike u inflamatornom odgovoru tokom starenja. Detaljno je opisana uloga estradiola i drugih polnih hormona, kao i estrogenskih receptora, u regulaciji inflamatornog odgovora i nastajanju polnih razlika u oksidativno-inflamatornom starenju. Istaknuto je da je, budući da su mehanizmi reproduktivnog starenja kod pacova slični kao kod ljudi, korišćenje pacova kao eksperimentalne životinje za ispitivanje polnog dimorfizma u uticaju reproduktivnog starenja na funkciju makrofaga sasvim opravdano. S obzirom da nakon ovarijektomije kod pacova značajno raste koncentracija cirkulišućeg estradiola, ali ne i progesterona, hirurška ovarijektomija ženki dodatno omogućava ispitivanje uticaja promene odnosa koncentracija cirkulišućih steroidnih hormona na inflamatorni odgovor peritonealnih makrofaga tokom starenja.

Ciljevi rada su jasno postavljeni – ispitivanje uticaja reproduktivnog starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike rezidentnih i tioglikolatnim medijumom indukovanih ćelija peritonealne šupljine pacova, kao i značaja genetskih faktora i polnih steroida za ove promene, što će se realizovati a) uporednom analizom ovih ćelija izolovanih iz neinflamirane

„mirne“ peritonealne duplje ženki AO pacova i peritonealne duplje ovih životinja kod kojih je tioglikolatom indukovano peritonitis, b) uporednom analizom ovih ćelija izolovanih iz peritonealne duplje ženki pacova AO i DA soja i c) uporednom analizom ovih ćelija izolovanih iz peritonealne duplje ženki i mužjaka pacova AO soja. Pored toga, cilj je bio i ispitivanje značaja promena u delovanju steroidnih hormona jajnika tokom rane faze reproduktivnog starenja za fenotipske i funkcionalne promene peritonealnih makrofaga ženki pacova AO soja, analizom uticaja promena u njihovom delovanju u *in vivo* uslovima (hirurška ovarijektomija na kraju reproduktivnog perioda) i nakon primene estradiola u *in vitro* uslovima.

Poglavlje **Materijal i metode** je organizovano u 13 potpoglavlja od kojih potpoglavljje *Hemikalije, antitela i imunokonjugati* navodi sve korišćene reagense. U potpoglavljju *Eksperimentalne životinje* navedeno je da su u istraživanjima korišćene ženke i mužjaci pacova AO soja, kao i ženke pacova DA soja uzrasta 2-4 meseca i 16-19 meseci. Detaljno je opisana procedura *određivanja faze estrusnog ciklusa kod ženki*, identifikacijom karakterističnih ćelija u vaginalnom brisu tokom 10 uzastopnih dana pre eksperimenta pri čemu su korišćene samo one ženke koje su na dan eksperimenta bile u fazi proestrusa. U potpoglavljju *Ovarijektomija* opisan je postupak bilateralne hirurške ovarijektomije ženki pacova AO soja. U posebnom potpoglavljju opisano je dobijanje seruma radi određivanja koncentracije polnih hormona hemiluminiscentnim enzimskim imunoesejom na analizatoru IMMULITE 1000. U sledećim potpoglavljima opisana je procedura indukovanja peritonitisa intraperitonealnim ubrizgavanjem TG i postupak izolovanja makrofaga iz peritonealne šupljine. Određivanje ekspresije antigena na makrofagama peritonealne šupljine rađeno je protočnom citofluorimetrijom nakon obeležavanja membranskih, unutarćelijskih i nuklearnih antigena, što je detaljno opisano u odgovarajućim potpoglavljima. Uzorci su analizovani na citometru FACS Verse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD) sa argonskim jonskim laserom talasne dužine 488 nm.

Funkcijske karakteristike i sekretorni profil makrofaga peritonealne šupljine određivan je u adherentnim makrofagama, odnosno onim koje su nakon inkubacije tokom 2h i ispiranja ostale na plastici mikrotitarskih ploča, u odsustvu ili prisustvu lipopolisaharida (LPS, stimulator TLR). U odgovarajućim potpoglavljima opisane su metode za određivanje: fagocitne aktivnosti makrofaga, aktivnosti enzima mijeloperoksidaze (MPO), produkcije azot-monoksida (NO), aktivnosti enzima arginaze i koncentracije sekretovanih proinflamatornih (IL-1 β , IL-6, TNF- α) i antiinflamatornih (TGF- β i IL-10) citokina ELISA testom. U posebnom potpoglavljju *Ispitivanje direktnog modulišućeg delovanja estradiola in vitro na promene u citokinskom profilu TG makrofaga tokom reproduktivnog starenja* opisano je određivanje sekretornog kapaciteta makrofaga nakon tretmana estradiolom *in vitro* u koncentraciji od 10⁻¹⁰M. Za čitanje optičkih gustina bojenih jedinjenja nastalih u ovim testovima korišćen je spektrofotometar tipa Multiscan Ascent plate reader (Labsystems, Helsinki, Finska).

U delu *Statistička evaluacija rezultata* navedeno je da je korišćena statistička metoda jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) uz primenu Bonferroni testa za *post hoc* poređenje. Podaci su analizirani primenom statističkog programa GraphPad Prism 5 (GraphPadSoftware, Inc., CA, USA).

Sve metode i procedure korišćene u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije su prikladne i u saglasnosti sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti, što je omogućilo dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata na osnovu kojih je bilo moguće donošenje adekvatnih naučnih zaključaka.

U poglavlju **Rezultati** predstavljeni su originalni rezultati dobijeni u sklopu istraživanja ove doktorske disertacije. Dat je detaljan opis i rezultati su prikazani grafički, kroz 50 slika.

U poglavlju **Diskusija** prikazana je detaljna analiza rezultata dobijenih u okviru ove disertacije, u kontekstu dostupnih literaturnih podataka.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najvažniji zaključci koji proističu iz rezultata sprovedenog istraživanja i koji su u skladu sa postavljenim ciljevima rada.

Na kraju doktorske disertacije nalazi se poglavlje **Literatura**, u kom su navedene sve reference (ukupno 454) koje su korišćene tokom izrade ove doktorske disertacije.

5. OSTVARENI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u doktorskoj disertaciji predstavljeni su u pet celina (potpoglavlja) U prvoj celini prikazani su rezultati ispitivanja uticaja reproduktivnog starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike peritonealnih makrofaga ženki pacova AO soja. Budući da makrofage odgovaraju na različite signale iz mikrosredine menjajući fenotipske i funkcijske karakteristike (Xu i sar, 2013), prikazani su rezultati dobijeni sa makrofagama koje su izolovane iz „mirnog“ peritoneuma intaktnih ženki, i makrofagama izolovanim 7. dana nakon hemijske indukcije peritonitisa davanjem tioglikolata. Pokazano je da kod pacova faza rezolucije inflamacije, koju karakteriše izražena akumulacija makrofaga (Lam i sar, 2013) i od čije uspešnosti zavisi završetak akutne inflamacije, nastupa oko 7. dana od indukcije peritonitisa (Hekking i sar, 2005). Tokom ispitivanog perioda reproduktivnog starenja došlo je do gubitka cikličnosti u oslobađanju steroidnih hormona jajnika. Generalno, koncentracija estradiola u cirkulaciji se blago smanjila (oko 20%), dok je pad u koncentraciji progesterona bio izraženiji (oko 50%), tako da je odnos njihovih koncentracija pomećen na stranu estradiola, što je evidentno uticalo na fenotipske i funkcijske karakteristike makrofaga peritonealne šupljine.

Pokazano je da se ukupan broj ćelija izolovanih iz „mirne“ (neinflamirane) peritonealne duplje, kao ni procentualni odnosi između subpopulacije zrelih rezidentnih makrofaga (Guilliams i sar, 2013; Yosef i sar, 2018) koje većinski eksprimiraju CD163 molekul, i onih koje potiču od monocita i koji su identifikovani na osnovu gustine ekspresije CD68 (Cohn i Benson, 1965) nisu značajno razlikovali između mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja. Međutim, procentualna zastupljenost CD169+ makrofaga, za koje je pokazano da imaju prevashodno ulogu u regulaciji inflamacije i imunskog odgovora, a ne u održavanju tkivne homeostaze (Chávez-Galán i sar, 2015), se značajno smanjivala u okviru makrofaga izolovanih iz „mirne“ peritonealne duplje ženki AO pacova tokom posmatranog perioda reproduktivnog starenja. Ispitivanjem fagocitne sposobnosti makrofaga pokazano je da sposobnost preuzimanja zimosana A od strane makrofaga izolovanih iz „mirne“ peritonealne duplje mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja bila u potpunosti komparabilna bez obzira na stimulaciju lipopolisaharidom. S druge strane, bez obzira na stimulaciju LPS-om, aktivnost MPO je bila niža u makrofagama izolovanim iz peritonealne šupljine sredovečnih ženki AO pacova u poređenju s mladim. Rezultati ispitivanja sposobnosti makrofaga izolovanih iz „mirne“ peritonealne duplje da sintetišu NO pokazuju da je produkcija ovog proinflamatornog medijatora u peritonealnim makrofagama stimuliranim LPS-om bila veća kod sredovečnih nego kod mladih ženki dok je u odsustvu stimulacije bila slična između sredovečnih i mladih ženki. Stimulacija LPS-om je povećala sintezu uree i u makrofagama mladih i u makrofagama sredovečnih ženki pacova AO soja, ali tako da je ovo povećanje, bilo manje u makrofagama sredovečnih životinja. Pored toga, pokazano je da nakon stimulacije LPS-om makrofage

sredovečnih ženki AO pacova sintetišu značajno manje proinflammatory citokina (IL-1, IL-6, TNF- α), a više antiinflammatory citokina. Rezultati dobijeni korišćenjem makrofaga izolovanih iz peritonealne duplje pacova kod kojih je tioglikolatom izazvan peritonitis, pokazuju da tretman tioglikolatom i kod mladih i kod sredovečnih ženki AO pacova značajno povećava broj ćelija u peritonealnom eksudatu, ali dovodi do smanjenja procentualne zastupljenost CD163+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga samo kod mladih ženki, dok je, u isto vreme, gustina ekspresije CD68 molekula na CD68+ TG makrofagama ženki obe starosti bila niža u odnosu na rezidentne makrofage. Pored toga, pokazano je da je samo kod mladih ženki AO pacova tretiranih tioglikolatom, procenat ćelija koje ekspimiraju CCR7, molekul koji se smatra jednim od markera makrofaga monocitnog porekla (Gordon i Taylor, 2005) i ukazuje na njihovu M1 polarizaciju (Martinez i sar, 2006), bio povećan, dok je procentualna zastupljenost CD169+ ćelija bila povećana u peritonealnoj duplji i mladih i sredovečnih AO ženki. Pored toga, analiza ekspresije molekula koji imaju ulogu u aktivaciji makrofaga je pokazala da je procenat TLR4+ ćelija i MHCII+ ćelija bio značajno niži kod starih nego kod mladih životinja. U funkcionalnom smislu, makrofage izolovane iz peritonealne duplje pacova kod kojih je tioglikolatom izazvan peritonitis pokazivale su veću fagocitnu sposobnost u odnosu na ćelije izolovane iz "mirne" peritonealne duplje bez obzira na starost, pri čemu je fagocitna sposobnost TG makrofaga sredovečnih ženki bila veća u odnosu na mlade ženke. Dodatno, rezultati pokazuju da se tokom reproduktivnog starenja smanjuje aktivnost MPO ali povećava sinteza NO u TG makrofagama. Rezultati dobijeni analizom citokinskog profila pokazuju da je citokinski sekretorni profil TG makrofaga sličan onom kod makrofaga "mirnog" peritoneuma, tj reproduktivnim starenjem dolazi do smanjenja sinteze/sekrecije proinflammatory i porasta antiinflammatory citokina.

U drugom delu poglavlja Rezultati prikazani su rezultati vezani za ispitivanje sojnih razlika (genetskih faktora) u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama/promenama peritonealnih makrofaga tokom reproduktivnog starenja. Rezultati pokazuju da je u fazi rezolucije inflamacije, 7. dana od ubrizgavanja tioglikolata, broj ćelija u peritonealnom eksudatu bio manji kod ženki pacova DA soja u odnosu na ženke pacova AO soja bez obzira na starost životinja. Procentualna zastupljenost CD68+ makrofaga (makrofage monocitnog porekla) bila je veća kod mladih jedinki DA soja u odnosu na jedinke AO soja odgovarajuće starosti. Budući da je procenat CD68+ ćelija rastao samo kod pacova AO soja starenjem, njihov procenat je bio sličan kod sredovečnih životinja ova dva soja. Kod mladih, kao i kod sredovečnih ženki DA pacova procentualna zastupljenost ćelija koje ekspimiraju CD163, klasičan marker zrelih rezidentnih makrofaga (Guilliams i sar, 2013; Yosef i sar, 2018) u okviru CD68+ makrofaga bila je značajno niža u odnosu na zastupljenost kod ženki AO soja odgovarajućeg uzrasta. Za razliku od sredovečnih ženki DA pacova, u inflamatornom peritonealnom eksudatu sredovečnih ženki AO pacova, bilo je procentualno manje CD169+ makrofaga koje bi mogle da doprinesu razvoju inflamacije. Fagocitna sposobnost makrofaga izolovanih iz pacova DA soja se nije menjala tokom reproduktivnog starenja, dok je fagocitna sposobnost peritonealnih makrofaga pacova AO soja rasla. Makrofage sredovečnih pacova AO soja su pokazivale bolju fagocitnu sposobnost, a manju aktivnost MPO-a i sintezu NO. Pored toga, makrofage sredovečnih ženki pacova AO soja su proizvele više antiinflammatory citokina, koji ograničavaju razvoj akutne inflamacije i dovode do njene rezolucije (Mietto i sar 2015, Fadok i sar, 1998), a manje oštećujućih proinflammatory citokina, dok su ove ćelije sredovečnih pacova DA soja proizvele više IL-1 β , a manje antiinflammatory citokina. S druge strane, pokazano je da makrofage sredovečnih AO ženki sintetišu više TGF- β u poređenju sa sredovečnim DA pacovima.

U narednom delu poglavlja Rezultati prikazani su rezultati koji pokazuju polne specifičnosti u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama/promenama TG makrofaga peritonealne šupljine

tokom reproduktivnog starenja. Nalazi pokazuju da se kod ženki tokom reproduktivnog starenja smanjuju serumske koncentracije estradiola i progesterona, ali da se usled drastičnijih promena u koncentraciji progesterona njihov odnos pomera prema estradiolu, dok se koncentracija testosterona ne menja. Kod mužjaka su vrednosti koncentracija estradiola u serumu tokom starenja rasle, ali se koncentracija testosterona smanjivala, verovatno usled pojačane sinteze estradiola delovanjem aromataza. Kod mladih životinja nije bilo polnih razlika u ukupnom broju ćelija izolovanih iz peritonealnog eksudata, a broj ćelija se, uprkos povećanju telesne mase mužjaka, nije menjao starenjem ni u jednom od polova. Slično tome, kod mladih životinja nije bilo razlike u zastupljenosti CD68+ makrofaga između polova i u oba pola se starenjem povećavao broj CD68+ makrofaga. Međutim, tokom reproduktivnog starenja se gustina ekspresije CD68 molekula na CD68+ makrofagama povećavala samo kod mužjaka. Analiza ekspresije molekula koji imaju ulogu u aktivaciji makrofaga je pokazala da se kod ženki AO pacova starenjem smanjivala zastupljenost TLR4+ i MHCII+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga, dok je kod mužjaka taj procenat rastao. Sličan trend tokom starenja (porast kod mužjaka, smanjenje kod ženki) je primećen i u procentualnoj zastupljenosti CD169+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga. Procenat CD163+ ćelija rastao je tokom starenja u oba pola, pri čemu je do povećanja gustine ekspresije CD163 molekula u okviru CD163+ populacije došlo samo kod mužjaka. Fagocitni kapacitet makrofaga se tokom starenja povećavao u nestimulisanim makrofagama ženki, tako da je kod sredovečnih ženki bio značajno viši u odnosu na sredovečne mužjake, dok nije bilo polnih razlika u fagocitozi zimozana A od strane makrofaga stimulisanih LPS-om ni kod mladih ni kod sredovečnih životinja. MPO aktivnost makrofaga mladih ženki je bila niža, a sredovečnih viša, u odnosu na ćelije mužjaka odgovarajuće starosti. S druge strane, nestimulisane makrofage sredovečnih pacova oba pola su proizvele više NO u odnosu na ćelije mladih životinja, a ćelije mladih mužjaka su i nakon stimulacije LPS-om imale veću produkciju NO u odnosu na mlade ženke. Makrofage sredovečnih mužjaka su proizvele veće količine proinflatornog IL-1 β , a manje antiinflatornog citokina TGF- β u odnosu na ćelije ženki iste starosti.

U narednom potpoglavlju prikazani su rezultati ispitivanja uzrasno-zavisnih promena u sekretornim karakteristikama makrofaga AO pacova kojima su hirurški uklonjeni jajnici na kraju reproduktivnog perioda, što je dovelo do drastičnog pada koncentracije progesterona i blagog smanjenja koncentracije estradiola uz smanjenje gustine estrogenskih receptora (ER) kod sredovečnih pacova. Rezultati pokazuju da je produkcija NO bila komparabilna, a sekrecija uree i proinflatornih citokina IL-1 β i TNF- α niža u populaciji makrofaga ovarijektomisanih u odnosu na intaktne životinje. S druge strane, nestimulisane makrofage ovarijektomisanih ženki proizvele su značajno veće količine antiinflatornog citokina TGF- β i značajno manje koncentracija IL-10 u odnosu na intaktne sredovečne ženke, dok je nakon stimulacije LPS-om produkcija TGF- β bila niža, a produkcija IL-10 komparabilna u uzorcima ovarijektomisanih u odnosu na intaktne ženke.

Na kraju poglavlja Rezultati prikazani su nalazi vezani za ispitivanje delovanja estradiola *in vitro* na citokinski profil TG makrofaga. U makrofagama mladih ženki stimulisanim LPS-om tretman estradiolom (10^{-10} M) *in vitro* dovodi do povećanja sekrecije IL-6 i TNF- α i smanjenja sekrecije IL-1 β u odnosu na ćelije samo stimulisane LPS-om. U makrofagama sredovečnih ženki je *in vitro* tretman estradiolom doveo do povećanja sekrecije IL-1 β i IL-6 u odnosu na netretirane makrofage, a nije imao uticaja na produkciju TNF- α . U odnosu na netretirane ćelije, tretman estradiolom (10^{-10} M) *in vitro* dovodi do povećanja sekrecije TGF- β makrofaga mladih, ali nema uticaja na sekreciju ovog citokina u makrofagama sredovečnih ženki.

6. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

U okviru poglavlja Diskusija, dobijeni rezultati istraživanja su detaljno analizirani i razmatrani u kontekstu dostupnih literaturnih podataka.

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazuju da se tokom posmatranog perioda reproduktivnog starenja menja funkcijski profil peritonealnih makrofaga izolovanih iz “mirne” i inflamirane peritonealne duplje, što se bar delimično može povezati sa uzrasno-zavisnim promenama u odnosu subpopulacija koje ulaze u sastav makrofagne populacije. Ispitivanja fagocitne sposobnosti makrofaga je pokazalo da je sposobnost preuzimanja zimozana A od strane makrofaga izolovanih iz “mirne” peritonealne duplje mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja bila u potpunosti komparabilna bez obzira na stimulaciju lipopolisaharidom. Podaci iz literature ukazuju da se starenjem smanjuje fagocitna sposobnost rezidentnih peritonealnih makrofaga miša (merena testovima *in vivo*), ali ne i fagocitna sposobnost makrofaga monocitnog porekla, i da ovaj efekat starenja nije vezan za intrizična svojstva rezidentnih makrofaga već za delovanje faktora iz njihovog okruženja (Linehan i sar, 2014). Prema tome, diskrepanca između nalaza dobijenih u sklopu ove doktorske disertacije i u ispitivanjima Linehan-a i sar. (2014), mogla bi se objasniti činjenicom da je rezultat prikazan u disertaciji dobijen u ispitivanjima *in vitro*. Nakon stimulacije lipopolisaharidom makrofage sredovečnih ženki AO pacova su sintetisale značajno manje proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6, TNF- α). Imajući u vidu da relativna zastupljenost subpopulacija makrofaga u tkivu značajno utiče na funkcijski kapacitet ukupne populacije (Epelman i sar, 2014), smanjenje udela CD169+ ćelija, koje sekretuju manje proinflamatornih citokina nego CD169- ćelije (Liu i sar, 2020), u ukupnoj populaciji makrofaga tokom reproduktivnog starenja bi moglo u izvesnoj meri da doprinesu smanjenju sinteze proinflamatornih citokina makrofaga sredovečnih ženki. Činjenica da makrofage sredovečnih životinja sintetišu i veće količine NO (da u njima dolazi do disregulacije sinteze NO), najverovatnije usled protrahovanog izlaganja manjim koncentracijama estrogena i progesterona (Coughlan i sar, 2005) je takođe bila u skladu sa manjom sintezom proinflamatornih citokina u ukupnoj populaciji peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki. Naime, pokazano je da NO aktivno suprimira sintezu proinflamatornih citokina (Kobayashi, 2010). Ovi nalazi su dalje diskutovani i u svetlu rezultata disertacije koji pokazuju da je u peritonealnim makrofagama sredovečnih ženki bila povećana sinteza/sekrecija IL-10, što bi se delimično moglo povezati sa protrahovanim izlaganjem ovih ćelija nižim koncentracijama estrogena, s obzirom da estradiol inhibiše sintezu IL-10 (Angele i sar, 2000), a da je takođe pokazano da bi smanjenje koncentracije estradiola moglo da utiče i na sintezu proinflamatornih citokina (Miller i Hunt, 1996).

U funkcionalnom smislu, makrofage izolovane iz peritonealne duplje pacova kod kojih je tioglikolatom izazvan peritonitis pokazivale su veću sposobnost preuzimanja zimozana A u odnosu na ove ćelije izolovane iz “mirne” peritonealne duplje, bez obzira na starost. S obzirom da je zimozan A polisaharid D-glukoznih monomera povezanih β -1,3 glikozidnim vezama koga ćelije prepoznaju, vezuju i fagocituju posredstvom dektina-1 (Herre i sar, 2004), porast fagocitne sposobnosti peritonealnih makrofaga nakon tretmana tioglikolatom može se povezati sa činjenicom da tioglikolat ushodno reguliše ekspresiju dektina-1 (Herre i sar, 2004), dok bi se izostanak značajnijeg povećanja fagocitoze zimozana A u prisustvu LPS-a mogao pripisati nishodnoj regulaciji ekspresije dektina-1 u odgovoru na stimulaciju LPS-om (Willment i sar, 2003). Kako i koncentracija estradiola i dužina ekspozicije delovanja ovog hormona u određenoj koncentraciji može uticati na ekspresiju dektina-1 (Costa i sar, 2020), veća fagocitna sposobnost TG makrofaga sredovečnih u odnosu na ženke mladih životinja

mogla bi da se objasni reproduktivnim starenjem uslovljenim razlikama u ekspresiji ovog molekula. Bez obzira na relativno visoku zastupljenost regulatornih CD169+ tioglikolatih makrofaga sredovečnih životinja u odnosu na makrofage "mirnog" peritoneuma životinja iste starosti, citokinski sekretorni profil ovih ćelija je pokazivao trend sličan onom kod makrofaga "mirnog" peritoneuma – reproduktivnim starenjem indukovno smanjenje sinteze/sekrecije proinflamatornih i porast antiinflamatornih citokina. Ovi rezultati su diskutovani, osim u svetlu prethodno navedene povećane sinteze NO, i uz osvrt na uzrasno-zavisne promene u odnosu subpopulacija koje ulaze u sastav makrofagne populacije, odnosno smanjenje zastupljenosti ćelija monocitnog porekla u okviru TG populacije sredovečnih ženki. Treba istaći da bi ovo moglo da implicira smanjenje antimikrobnog kapaciteta peritonealnih makrofaga inicijacijom reproduktivnog starenja, ali i pojačanu sklonost ka razvoju fibroze peritoneuma, usled pojačane sinteza antiinflamatornog TGF- β , koji ima ključnu ulogu u inicijaciji, progresiji i održavanju fibroze peritoneuma (Hu i sar, 2012).

U drugom delu istraživanja pokazano je da se reproduktivnim starenjem na sojno specifičan način menjao ćelijski sastav inflamatornog peritonealnog eksudata, fagocitna sposobnost ovih ćelija, njihova enzimaska aktivnost i citokinski profil. Naime, rezultati su pokazali da je broj ćelija u peritonealnom eksudatu 7. dana posle davanja TG bio manji i kod mladih i kod sredovečnih ženki pacova DA soja u odnosu na pacove AO soja odgovarajuće starosti. Pored toga, kod sredovečnih ženki pacova AO soja nađena je veća zastupljenost ćelija monocitnog porekla i zrelih rezidentnih ćelija koji ekspimiraju CD163, marker „klasičnih“ zrelih rezidentnih ćelija u poređenju sa životinjama istog pola i uzrasta DA soja. Kod životinja DA soja su dominirale ćelije koje ispoljavaju CD169 marker, čija se ekspresija povezuje sa imunoregulatornim karakteristikama ćelija i za koje se smatra da potiču od rezidentnih prekursora ćelija. Ovaj nalaz sojnih razlika u sastavu peritonealnog eksudata je u skladu s podacima dobijenim kod miševa (Festingi i sar 2011). Izrazito velika zastupljenost CD169+ ćelija kod DA pacova bi mogla da se posmatra i u kontekstu podataka koji ukazuju da se značajno povećan broj CD169+ makrofaga dovodi u vezu sa razvojem hronične inflamacije (Wangi sar 2017), autoimunskih bolesti i tumora (Liu i sar, 2020), odnosno da negativno utiče na „uspešno“ starenje. S druge strane, kako se tokom reproduktivnog starenja kod pacova AO soja dodatno povećavala zastupljenost CD163+ a smanjivala zastupljenost CD169+ makrofaga u peritonealnom eksudatu, a ekspresija CD163 molekula se povezuje s fagocitozom (Kneidl i sar, 2012) ovi nalazi bi mogli da se dovedu u vezu sa boljim fagocitnim kapacitetom makrofaga sredovečnih ženki AO soja u odnosu na ženke DA soja iste starosti. Sojne razlike u uticaju starenja na fagocitozu su prethodno opisane kod miševa, a smanjenje fagocitne sposobnosti makrofaga se povezuje s kraćim životnim vekom (Guayerbas i De La Fuente, 2003). Makrofage ženki pacova AO soja su proizvodile više antiinflamatornih citokina, koji ograničavaju razvoj akutne inflamacije i dovode do njene rezolucije (Fadok i sar, 1998), a manje oštećujućih proinflamatornih citokina, dok su ove ćelije sredovečnih pacova DA soja proizvodile više IL-1 β , a manje antiinflamatornih citokina. To bi takođe moglo da se poveže sa boljom kontrolom inflamatornog odgovora i podacima koji ukazuju da AO pacovi „uspešnije“ stare (Dimitrijević i sar, 2014). S druge strane, značajno veća sinteza TGF- β u makrofagama sredovečnih AO u odnosu na DA ženke, mogla bi da implicira i izraženiju sklonost ka fibrozi peritoneuma ukoliko ne dođe do potpune rezolucije inflamacije (Hu i sar, 2012).

Uprkos tome što je seksualni dimorfizam i diergizam u urođenoj imunosti dobro poznat i povezan je sa razlikama u koncentraciji polnih steroida u cirkulaciji, s obzirom na njihov direktan efekat na inflamatorni kapacitet ovih ćelija (Shepherd i sar, 2021), podaci o uticaju starenja na polno-zavisne razlike u funkcijskom/inflamatornom kapacitetu makrofaga, posebno o njihovom kapacitetu da kontrolišu rezoluciju akutne inflamacije, nisu dovoljno

dokumentovani. Iako se procentualna zastupljenost CD68+ makrofaga u peritonealnom eksudatu nije razlikovala između mladih mužjaka i ženki AO pacova, i povećavala se u istoj meri tokom perioda reproduktivnog starenja kod životinja oba pola, gustina ekspresije ovog molekula je bila viša kod makrofaga mužjaka što je ukazivalo na manje učešće ćelija monocitnog porekla u peritonealnom eksudatu (Cohn i Benson, 1965). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa podacima dobijenim kod miša koji pokazuju da u repopulaciji peritonealnih makrofaga kod mužjaka, za razliku od ženki, učestvuju većinski ćelije poreklom iz kostne srži, što se može povezati s promenama u lokalnom mikrokruženju koje nastaju nakon polnog sazrevanja, a koje makar delimično odražavaju promene u oslobađanju/delovanju polnih steroida (Bain i sar 2019). Nalaz koji pokazuje značajno veću procentualnu zastupljenost ćelija koje ispoljavaju CD163, marker dominantno zrelih rezidentnih ćelija embrionalnog porekla (Bain i sar, 2019; Louwe i sar, 2021), u okviru populacije CD68+ makrofaga sredovečnih u odnosu na mlade ženke, kao i smanjenje zastupljenosti CD169+ ćelija tokom starenja ženki, za razliku od mužjaka kod kojih se procenat ovih ćelija povećavao, bi trebalo sagledavati u sklopu podataka koji pokazuju da se veća zastupljenost CD169+ makrofaga može dovesti u vezu sa razvojem inflamacije (Wang i sar, 2017), autoimunskih bolesti i tumora (Liu i sar, 2021) i sledstveno, generalno, kraćim životnim vekom jedinki muškog pola u odnosu na jedinke ženskog pola (Lemaître i sar., 2020).

Ispitivanje funkcijskog kapaciteta makrofaga je pokazalo da nestimulisane makrofage sredovečnih pacova oba pola proizvode više NO u poređenju sa ćelijama mladih životinja istog pola, što može da se dovede u vezu sa podacima koji pokazuju da je NO supstrat za katalitičko razlaganje posredovano MPO-om (Abu-Soud i Hazen, 2000), te da smanjenje aktivnosti MPO makrofaga tokom starenja doprinosi većem oslobađanju NO iz makrofaga sredovečnih pacova. Imajući u vidu procentualnu zastupljenost ćelija koje ekspresiraju TLR4, jedan od ključnih molekula za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena čija ekspresija raste nakon aktivacije vezivanjem za njega specifičnih liganda (Fang i sar, 2017), nalazi koji ukazuju na veći procenat aktivisanih ćelija u okviru populacije makrofaga mladih ženki u odnosu na mlade mužjake bi se mogli povezati s činjenicom da endogeni estradiol potencira ekspresiju TLR4 na peritonealnim makrofagama miša (Rettew i sar, 2009), dok je testosteron suprimira (Rettew i sar, 2008). Starenjem uslovljene polno dimorfne promene u procentualnoj zastupljenosti TLR4+ ćelija, smanjenje kod ženki i porast kod mužjaka, su takođe korelirale s promenama u serumskoj koncentraciji estradiola. Ovaj nalaz, uz činjenicu da je fagocitna sposobnost peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki bila veća u poređenju sa onom izmerenom kod mužjake iste starosti, bi mogao da implicira manju TLR4-posredovanu reaktivnost i/ili bolju kontrolu akutne inflamacije kod sredovečnih ženki u poređenju s mužjacima istog uzrasta. Ove promene su takođe korelirale sa porastom makrofagne sinteze IL-1 β i TNF- α kod mužjaka i smanjenjem sinteze IL-1 β i IL-6 kod ženki. S obzirom na činjenicu da ekspresija TLR4 korelira sa stepenom aktivacije makrofaga u odgovoru na stimulaciju LPS-om (Frei i sar, 2010), može se zaključiti da starenje različito utiče na peritonealne makrofage mužjaka i ženki pacova AO soja. Peritonealne makrofage ženki prolaze kroz promene koje ih čine sposobnijim da kontrolišu inflamatorni odgovor i, moguće, manje podložnim za razvoj patologija povezanih sa hroničnom inflamacijom (Sayed i sar, 2021), što se makar delimično može povezati sa razlikama u koncentraciji polnih steroida.

U okviru sledećeg segmenta istraživanja, ženke AO pacova su podvrgnute bilateralnoj ovarijektomiji na kraju reproduktivnog perioda da bi se potvrdio značaj steroidnih hormona za promene koje nastaju u inflamatornom kapacitetu makrofaga, posebno, u njihovoj sposobnosti da kontrolišu inflamaciju. Budući da je 10 meseci od ovarijektomije odnos estradiol/progesteron bio oko dva puta veći u poređenju sa onim kod kontrolnih životinja (usled diskretnog smanjenja koncentracije estradiola i dramatičnog smanjenja koncentracija

progesterona), promene u inflamatornom potencijalu makrofaga ovarijektomisanih ženki mogle bi da budu posmatrane i kao rezultat izražene deficijencije progesterona. Izostanak drastičnijeg smanjenja koncentracije estradiola u cirkulaciji je verovatno posledica ekstragonadne sinteze ovog hormona (Zhao i sar, 2005). Deset meseci nakon ovarijektomije dolazi do smanjenja procentualne zastupljenosti makrofaga koje ekspimiraju receptore za progesteron (Stanojević i sar, 2015), što bi moglo da sugerise i manju gustinu ekspresije receptora za ovaj hormon. S obzirom da estradiol ushodno reguliše ekspresiju ER- α i ER- β (Aguirre i sar, 2010), a da progesteron ushodno reguliše ekspresiju ER- α (Daniel i sar, 2014), mogla bi se očekivati i manja gustina ekspresije ovih receptora na makrofagama sredovečnih ovarijektomisanih životinja u odnosu na kontrolne životinje. Kako progesteron povećava a estradiol smanjuje sekreciju IL-1 β i TNF- α iz makrofaga ženki miša (Huang i sar, 2008), smanjena sinteza/sekrecija IL-1 β i TNF- α ovarijektomisanih ženki mogla bi se delimično povezati sa promenama odnosa ovih hormona. Odsustvo razlika u produkciji proinflatarnog IL-6 peritonealnih makrofaga ovarijektomisanih u odnosu na kontrolne životinje sugerise i različitu osetljivost citokina na modulatorno delovanje steroidnih hormona. Smanjena sinteza/sekrecija IL-10 u makrofagama ovarijektomisanih pacova je u skladu sa nalazima koji pokazuju da estradiol deluje stimulatorno na produkciju IL-10 (Shivers i sar, 2015). Međutim, povećanje sinteze TGF- β u bazalnim uslovima i smanjenje nakon stimulacije LPS-om u makrofagama ovarijektomisanih životinja nije jednostavno objasniti, s obzirom da literaturni podaci pokazuju da progesteron povećava sintezu TGF- β (Xie i Cao, 2019), dok je estradiol povećava (Xie i Cao, 2019), ili smanjuje (Jeng i sar, 1993) u zavisnosti od tipa ćelije i uslova stimulacije. Može se pretpostaviti da su efekti estradiola na sintezu antiinflamatornih citokina bitno različiti bazalno i u uslovima kada je ćelija izložena delovanju inflamatornih stimulusa, kao što je to pokazano kod proinflatarnih citokina (Dragin i sar, 2017). Dobijeni rezultati sugerisu da u prisustvu niskih koncentracija progesterona u cirkulaciji i nešto manjih koncentracija estradiola (bez cikličnih promena vezanih za faze estrusnog ciklusa) u uslovima manje gustine ER, peritonealne makrofage pokazuju manju sposobnost aktivacije i/ili bolju kontrolu inflamatornog odgovora.

Konačno, nalazi disertacije pokazuju da se modulatorno delovanje estradiola u *in vitro* uslovima na citokinski profil TG makrofaga menja tokom reproduktivnog starenja. Nalazi pokazuju uzrasno-zavisni uticaj estradiola *in vitro* na sintezu/sekreciju IL- β (supresija kod mladih, potencijacija kod sredovečnih ženki) i u skladu su sa podacima iz literature koji pokazuju da efekti estradiola zavise od njegove koncentracije, odnosno da ovaj hormon u nižim koncentracijama potencira, a u višim suprimira sintezu IL-1 β u makrofagama i monocitima (Hu i sar, 1988; Morishita i sar, 1999). Budući da sekretorni odgovor proinflatarnih citokina na stimulaciju LPS-om zavisi od prethodne izloženosti makrofaga delovanju estrogena (Ruh i sar, 1998), a da su makrofage peritonealne šupljine ženki, zahvaljujući postojanju komunikacije između periovarijalnog prostora i peritonealne šupljine (Gaytan i sar, 1991), izložene estradiolu iz jajnika i uterusa, može se pretpostaviti da su makrofage mladih ženki pre izolacije iz peritonealne šupljine bile izložene višim koncentracijama estradiola u odnosu na makrofage sredovečnih. S druge strane, tretman estradiolom *in vitro* je doveo do povećanja sekrecije proinflatarnih IL-6 i TNF- α , što ukazuje na činjenicu da estradiol, zavisno od tipa ER (makrofage pacova ispoljavaju oba tipa receptora) na koji deluje i (ko)faktora sa kojim stupa u interakciju može i da aktivise i da suprimira ekspresiju gena (Macgregor i Jordan, 1998; Parker, 1998). Povećanje sinteze IL-6 u makrofagama mladih ženki bi se moglo pripisati i činjenici da TNF- α , u sklopu složene mreže međusobne regulacije citokina, dovodi do njegove ushodne regulacije (Dinarello, 1987), dok je povećanje sinteze IL-6 u makrofagama sredovečnih ženki verovatno posledica delovanja estradiola posredstvom ER- α na sintezu prostaglandina E2 (PGE2) (Lu i sar, 2004). Ovaj

prostaglandin suprimira sintezu TNF- α , a stimuliše sekreciju IL-6 (Ghezzi i sar, 2000), a sposobnost ćelija da sintetišu PGE2 se povećava starenjem (Wu i sar, 1998). Nalaz koji pokazuje da estradiol *in vitro* stimuliše sintezu TGF- β u TG makrofagama mladih pacova je u skladu sa podacima iz literature (Gantus i sar, 2011), ali izostanak njegovog delovanja na sintezu TGF- β u ćelijama sredovečnih ženki može da se poveže sa starenjem uslovljenim promenama u ekspresiji ER i/ili interakciji estradiola s transkripcionim faktorima/kofaktorima koji određuju delovanje estrogena, a zavise od njegove koncentracije. Ispitivanja uticaja estradiola *in vitro* na LPS-om stimulisanu sintezu inflamatornih citokina idu u prilog modulatornom delovanju estrogena na inflamatorni kapacitet TG makrofaga i ukazuju da se njihov modulatorni kapacitet menja u toku reproduktivnog starenja, sugerirajući da u toku ovog perioda dolazi do promena u samim makrofagama (indukovanih delovanjem drugih egzogenih ili intrinzičkih faktora) koje menjaju njihov odgovor na delovanje estrogena.

Citirana literatura

- Abu-Soud, H. M., & Hazen, S. L. (2000). Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5425–5430. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5425>
- Aguirre, C., Jayaraman, A., Pike, C., & Baudry, M. (2010). Progesterone inhibits estrogen-mediated neuroprotection against excitotoxicity by down-regulating estrogen receptor- β . *Journal of Neurochemistry*, 115(5), 1277–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07038.x>
- Angele, M. K., Ayala, A., Schwacha, M. G., Cioffi, W. G., Bland, K. I., & Chaudry, I. H. (2000). Immune dysfunction following trauma-haemorrhage: Influence of gender and age. *Cytokine*, 12(1), 69–77. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0511>
- Bain, C. C., Gibson, D. A., Steers, N. J., Boufea, K., Louwe, P. A., Doherty, C., Huici, V., Gentek, R., Magalhaes-Pinto, M., Bajenoff, M., Benezech, C., Dockrell, D., Saunders, P. T. K., Batadar, N., & Jenkins, S. J. (2019). Origin and microenvironment contribute to the sexually dimorphic phenotype and function of peritoneal macrophages. *BioRxiv*, 837336. <https://doi.org/10.1101/837336>
- Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue MAY, p. 263). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>
- Cohn, Z. A., & Benson, B. (1965). The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry. *The Journal of Experimental Medicine*, 121(1), 153–170. <https://doi.org/10.1084/jem.121.1.153>
- Costa, M. C., Barros Fernandes, H., Gonçalves, G. K. N., Santos, A. P. N., Ferreira, G. F., Freitas, G. J. C., Carmo, P. H. F., Hubner, J., Emídio, E. C. P., Santos, J. R. A., Santos, J. L., Reis, A. M., Fagundes, C. T., Silva, A. M., & Santos, D. A. (2020). 17 β Estradiol increases macrophage activity through activation of the G protein coupled estrogen receptor and improves the response of female mice to *Cryptococcus gattii*. *Cellular Microbiology*, 22(6), e13179. <https://doi.org/10.1111/cmi.13179>
- Coughlan, T., Gibson, C., & Murphy, S. (2005). Modulatory effects of progesterone on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 93(4), 932–942. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03068.x>
- Daniel, A. R., Gaviglio, A. L., Knutson, T. P., Ostrander, J. H., D'Assoro, A. B., Ravindranathan, P., Peng, Y., Raj, G. V., Yee, D., & Lange, C. A. (2014). Progesterone receptor-B enhances estrogen responsiveness of breast cancer cells via scaffolding PELP1- and estrogen receptor-containing transcription complexes. *Oncogene* 2015 34:4, 34(4), 506–515. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.579>
- Dimitrijević, M., Stanojević, S., Vujić, V., Aleksić, I., Pilipović, I., & Laposavić, G. (2014). Aging oppositely affects TNF- α and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology*, 15(5), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9513-4>
- Dinarello, C. A. (1987). The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunology Letters*, 16(3–4), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(87\)90151-9](https://doi.org/10.1016/0165-2478(87)90151-9)

- Dragin, N., Nancy, P., Villegas, J., Roussin, R., Le Panse, R., & Berrih-Aknin, S. (2017). Balance between Estrogens and Proinflammatory Cytokines Regulates Chemokine Production Involved in Thymic Germinal Center Formation. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08631-5>
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Review Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, 41(1), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*, 101(4), 890–898. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>
- Fang, W., Bi, D., Zheng, R., Cai, N., Xu, H., Zhou, R., Lu, J., Wan, M., & Xu, X. (2017). Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01868-0>
- Festing, M. F. W. (1990). Inbred strains of mice, 12th. listing, and distribution of some polymorphisms among inbred strains. *Mouse Genome*, No. 88, 19–112.
- Frei, R., Steinle, J., Birchler, T., Loeliger, S., Roduit, C., Steinhoff, D., Seibl, R., Büchner, K., Seger, R., Reith, W., & Lauener, R. P. (2010). MHC class II molecules enhance toll-like receptor mediated innate immune responses. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008808>
- Gantus, M. A. V., Alves, L. M., Stipursky, J., Souza, E. C. L., Teodoro, A. J., Alves, T. R., Carvalho, D. P., Martinez, A. M. B., Gomes, F. C. A., & Nasciutti, L. E. (2011). Estradiol modulates TGF- β 1 expression and its signaling pathway in thyroid stromal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337(1–2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.02.001>
- Gaytan, F., Aceitero, J., Bellido, C., Sanchez-Criado, J. E., & Aguilar, E. (1991). Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biology of Reproduction*, 45(1), 27–33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.1.27>
- Ghezzi, P., Sacco, S., Agnello, D., Marullo, A., Caselli, G., & Bertini, R. (2000). LPS induces IL-6 in the brain and in serum largely through TNF production. *Cytokine*, 12(8), 1205–1210. <https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0697>
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Guayerbas, N., & De La Fuente, M. (2003). An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(4), 339–350. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00103-9)
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>
- Hekking, L. H. P., Zweers, M. M., Keuning, E. D., Driesprong, B. A. J., De Waart, D. R., Beelen, R. H. J., & Van Den Born, J. (2005). Apparent successful mesothelial cell transplantation hampered by peritoneal activation. *Kidney International*, 68, 2362–2367. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00698.x>
- Herre, J., Gordon, S., & Brown, G. D. (2004). Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular Immunology*, 40(12), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.007>
- Hu, W., Jiang, Z., Zhang, Y., Liu, Q., Fan, J., Luo, N., Dong, X., & Yu, X. (2012). Characterization of infiltrating macrophages in high glucose-induced peritoneal fibrosis in rats. *Molecular Medicine Reports*, 6(1), 93–99. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.890>
- Huang, H., He, J., Yuan, Y., Aoyagi, E., Takenaka, H., Itagaki, T., Sannomiya, K., Tamaki, K., Harada, N., Shono, M., Shimizu, I., & Takayama, T. (2008). Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages. *Journal of Medical Investigation*, 55(1–2), 133–141. <https://doi.org/10.2152/jmi.55.133>
- Jeng, M. H., ten Dijke, P., Iwata, K. K., & Jordan, V. C. (1993). Regulation of the levels of three

- transforming growth factor β mRNAs by estrogen and their effects on the proliferation of human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 97(1–2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(93\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(93)90217-8)
- Kneidl, J., Löffler, B., Erat, M. C., Kalinka, J., Peters, G., Roth, J., & Barczyk, K. (2012). Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cellular Microbiology*, 14(6), 914–936. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2012.01766.X>
- Kobayashi, Y. (2010). The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), 1157–1162. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>
- Lam, D., Harris, D., & Qin, Z. (2013). Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/931562>
- Lemaître, J. F., Ronget, V., Tidière, M., Allainé, D., Berger, V., Cohas, A., Colchero, F., Conde, D. A., Garratt, M., Liker, A., Marais, G. A. B., Scheuerlein, A., Székely, T., & Gaillard, J. M. (2020). Sex differences in adult lifespan and aging rates of mortality across wild mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(15), 8546–8553. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1911999117>
- Linehan, E., Dombrowski, Y., Snoddy, R., Fallon, P. G., Kissenpfennig, A., & Fitzgerald, D. C. (2014). Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell*, 13(4), 699–708. <https://doi.org/10.1111/ace1.12223>
- Liu, Y., Xia, Y., & Qiu, C. H. (2020). Functions of cd169 positive macrophages in human diseases (Review). *Biomedical Reports*, 14(2), 1–9. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1402>
- Louwe, P. A., Badiola Gomez, L., Webster, H., Perona-Wright, G., Bain, C. C., Forbes, S. J., & Jenkins, S. J. (2021). Recruited macrophages that colonize the post-inflammatory peritoneal niche convert into functionally divergent resident cells. *Nature Communications*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21778-0>
- Lu, B., Jiang, Y. J., & Choy, P. C. (2004). 17- β estradiol enhances prostaglandin E2 production in human U937-derived macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262(1–2), 101–110. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000038222.08915.84>
- Macgregor, J. I., & Jordan, V. C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 151–196. <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/content/full/50/2/151>
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7303–7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
- Mietto, B. S., Kroner, A., Girolami, E. I., Santos-Nogueira, E., Zhang, J., & David, S. (2015). Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *Journal of Neuroscience*, 35(50), 16431–16442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-15.2015>
- Miller, L., & Hunt, J. S. (1996). Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences*, 59(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00122-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00122-1)
- Parker, M. G. (1998). Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochemical Society Symposium*, 63, 45–50.
- Rettew, J. A., Huet-Hudson, Y. M., & Marriott, I. (2008). Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of Reproduction*, 78(3), 432–437. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>
- Rettew, J. A., Huet, Y. M., & Marriott, I. (2009). Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology*, 150(8), 3877–3884. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0098>
- Ruh, M. F., Bi, Y., D'Alonzo, R., & Bellone, C. J. (1998). Effect of estrogens on IL-1 β promoter activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66(4), 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00042-9)

- Sayed, N., Huang, Y., Nguyen, K., Krejciova-Rajaniemi, Z., Grawe, A. P., Gao, T., Tibshirani, R., Hastie, T., Alpert, A., Cui, L., Kuznetsova, T., Rosenberg-Hasson, Y., Ostan, R., Monti, D., Lehallier, B., Shen-Orr, S. S., Maecker, H. T., Dekker, C. L., Wyss-Coray, T., ... Furman, D. (2021). An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. *Nature Aging* 2021 1:7, 1(7), 598–615. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00082-y>
- Shepherd, R., Cheung, A. S., Pang, K., Saffery, R., & Novakovic, B. (2021). Sexual Dimorphism in Innate Immunity: The Role of Sex Hormones and Epigenetics. *Frontiers in Immunology*, 0, 3559. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.604000>
- Shivers, K. Y., Amador, N., Abrams, L., Hunter, D., Jenab, S., & Quiñones-Jenab, V. (2015). Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine*, 72(2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.007>
- Shu-Kuang Hu, Mitcho, Y. L., & Rath, N. C. (1988). Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, 10(3), 247–252. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90055-0)
- Sorachi, K. ichi, Kumagai, S., Sugita, M., Yodoi, J., & Imura, H. (1993). Enhancing effect of 17 β -estradiol on human NK cell activity. *Immunology Letters*, 36(1), 31–35. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90065-A](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90065-A)
- Stanojević, S., Kovačević-Jovanović, V., Dimitrijević, M., Vujić, V., Ćuruvija, I., Blagojević, V., & Lepsavić, G. (2015). Unopposed Estrogen Supplementation/Progesterone Deficiency in Post-Reproductive Age Affects the Secretory Profile of Resident Macrophages in a Tissue-Specific Manner in the Rat. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(5), 445–456. <https://doi.org/10.1111/aji.12424>
- Willment, J. A., Lin, H.-H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y. C., Gordon, S., & Brown, G. D. (2003). Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4569–4573. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4569>
- Wu, D., Mura, C., Beharka, A. A., Han, S. N., Paulson, K. E., Hwang, D., & Meydani, S. N. (1998). Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 275(3 44-3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.3.c661>
- Xie, J., & Cao, Y. (2019). Expression of TGF- β 1 and miR-99a in serum of patients with early spontaneous abortion and correlation with hormone levels during pregnancy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(6), 4593–4597. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7477>
- Xu, W., Zhao, X., Daha, M. R., & van Kooten, C. (2013). Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology*, 53(3), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.005>
- Yosef, N., Vadakkan, T. J., Park, J. H., Poché, R. A., Thomas, J. L., & Dickinson, M. E. (2018). The phenotypic and functional properties of mouse yolk-sac-derived embryonic macrophages. *Developmental Biology*, 442(1), 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.009>
- Zhao, H., Tian, Z., Hao, J., & Chen, B. (2005). Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-6>

7. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

- Stanislava Stanojević, **Ivana Ćuruvija**, Veljko Blagojević, Raisa Petrović, Ivana Prijić, Vesna Vujić. The involvement of estrogen receptors α and β in the in vitro effects of estradiol on secretory profile of peritoneal macrophages from naturally menopausal female and middle-aged male rats. *Experimental Gerontology* 2018; 113:86-94. doi:

10.1016/j.exger.2018.09.024 Impact factor (2016): 3,340; Rang časopisa u oblasti Geriatrics and Gerontology: 12/49

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

- **Ivana Ćuruvija**, Stanislava Stanojević, Nevena Arsenović-Ranin, Veljko Blagojević, Mirjana Dimitrijević, Biljana Vidić-Danković, Vesna Vujić. Sex differences in macrophage functions in middle-aged rats: relevance of estradiol level and macrophage estrogen receptor expression. *Inflammation* 2017; 40:1087-1101. doi: 10.1007/s10753-017-0551-3 Impact factor (2017): 2,884 Rang časopisa u oblasti Immunology: 87/155

Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

- **Ivana Ćuruvija**, Stanislava Stanojević, Veljko Blagojević, Raisa Petrović, Ivana Prijić, Vesna Vujić. 17 β -estradiol and genistein affect macrophage inflammatory cytokine production during aging in sex-specific manner. *Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches*, Belgrade, Serbia, 6-8 December 2019.

8. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Procedura provere originalnosti doktorske disertacije odložena je usled kašnjenja u nabavci softvera za proveru originalnosti, koja se odvija pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Izveštaj o proveri originalnosti biće dostavljen čim se obezbede uslovi da se softverska provera sprovede.

9. ZAKLJUČAK SA OBRAZLOŽENJEM NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata dipl. farm. Ivane Ćuruvije se zasniva na ispitivanju uticaja reproduktivnog starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike rezidentnih i tioglikolatnim medijumom indukovanih makrofaga peritonealne šupljine pacova, kao i značaja genetskih faktora i polnih steroida za ove promene. Zaključci disertacije, koji ukazuju na to da se već tokom rane faze reproduktivnog starenja menja modulatorno delovanje ženskih polnih steroida na sposobnost makrofaga pacova da kontrolišu razvoj inflamacije, što je od izuzetnog značaja za razvoj hronične inflamacije nasuprot “uspešnom” starenju, kao i da ove promene delimično zavise od same genetske osnove, ukazuju na kompleksnost regulacije inflamacije tokom starenja i faktora koji tome doprinose.

Detaljnou analizom priložene doktorske disertacije Komisija je konstatovala da je disertacija urađena prema odobroj prijavi, prikazana na jasan i pregledan način i da su svi postavljeni ciljevi u potpunosti realizovani. Eksperimenti su organizovani i sprovedeni u skladu sa savremenim standardima istraživanja u oblasti imunologije. Na kraju doktorske disertacije prikazani su zaključci izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i dostupnih literaturnih podataka.

Podaci predstavljeni u disertaciji daju originalan naučni doprinos boljem razumevanju polnih i genetski determinisanih razlika u razvoju inflamatorne patologije tokom starenja. Svemu navedenom u prilog ide činjenica da su rezultati ove doktorske disertacije do sada publikovani u okviru dva rada u međunarodnim časopisima, i to u jednom radu kategorije M21 i jednom radu kategorije M22, kao i da su saopšteni na skupu nacionalnog značaja.

10. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu svega izloženog Komisija smatra da je kandidat dipl. farm. Ivana Ćuruvija ispunila sve postavljene ciljeve u svojoj doktorskoj disertaciji i da rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos, što je potvrđeno njihovim objavljivanjem u dva rada u međunarodnim časopisima.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji dipl. farm Ivane Ćuruvije pod nazivom "Polne i sojne specifičnosti promena citokinskog profila makrofaga ženki pacova u reproduktivnom starenju" i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu.

U Beogradu, 15. 11. 2021. godine

Članovi Komisije:

1. 

dr sc. Stanislava Stanojević, naučni savetnik
Centar za imunološka istraživanja Branislav Janković
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

2. 

dr sc. Gordana Leposavić, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. 

dr sc. Marijana Stojanović, naučni savetnik
Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“